

УДК 576.52

DOI: 10.18413/2409-0298-2017-3-1-14-18

Рядинская А.Г.,  
Сыроватская О.В.

**РЕЛЬЕФ ПОВЕРХНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ОСТРОГО МИЕЛОБЛАСТНОГО ТИПА ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК КРОВИ**

**Аннотация**

В выполненном исследовании изучены особенности рельефа поверхности лимфоцитов больных острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) на стадии лечения и ремиссии болезни. Изучение данного вопроса позволит установить изменения структурно-функциональных и биологических свойств, характерных для неопластической клетки в период лечения и ремиссии, а также разработать терапевтические подходы, направленные на уничтожение аномальных клеток. При развитии ремиссии у больных острым миелобластным лейкозом число глобулярных выступов снизилось на 78,2% ( $p < 0,05$ ), на фоне снижения их высоты и увеличения ширины соответственно на 22% и 649% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. Глубина углублений плазмалеммы увеличилась на 128,3% ( $p < 0,05$ ), ширина уменьшилась на 72% ( $p < 0,05$ ), а их число – сократилось на 56,6% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. Выявленные особенности имеют значение для понимания патогенеза миелопролиферативных заболеваний.

**Ключевые слова:** рельеф поверхности; лимфоциты; острый миелобластный лейкоз.

UDC 576.52

Ryadinskaya A.G.,  
Syrovatskaya O.V.

**THE RELIEF OF SURFACE OF THE LYMPHOCYTES IN THE CONDITION OF ACUTE MYELOID PROLIFERATION TYPE OF BLOOD CELLS**

**Abstract**

In the current research, the authors studied the features of the relief surface of lymphocytes in patients with acute myeloblastic leukemia (AML) during the treatment and remission stage. The study of this issue allows to establish the changes in structural, functional and biological properties characterizing neoplastic cells during the treatment and remission stage, and also to develop therapeutic approaches aimed at killing the abnormal cells. During the remission in patients with acute myeloid leukemia, the number of globular projections decreased by 78.2% ( $p < 0.05$ ), on the background of reducing their height and increasing the width of respectively 22% and 649% ( $p < 0.05$ ) compared with control. The depth of the grooves of the plasma membrane increased by 128,3% ( $p < 0.05$ ), the width decreased by 72% ( $p < 0.05$ ), and their number decreased by 56.6% ( $p < 0.05$ ) compared with control. The detected features are important for understanding the pathogenesis of myeloproliferative diseases.

**Key words:** relief of surface; lymphocytes; acute myeloblastic leukemia.

Рельеф клеточной поверхности представляет собой совокупность морфологических образований, которые участвуют в реализации целого спектра морфофизиологических реакций [14, 16]. Например, в литературе описано явление «пузырьковой мембранной миграции», характерной для раковых клеток, которые используют ее для инвазии во внеклеточный матрикс, реализуется этот феномен посредством пузырьковых структур биомембраны [18]. Согласно данным ряда исследователей, характер рельефа поверхности мембраны тесно связан с числом активизирующих белков в клетке, которые принимают непосредственное участие в формировании выступов на плазмалемме [7, 11, 12].

Развитие острого миелобластного типа пролиферации в системе крови приводит к накоплению в кровотоке blasts миелоидного ряда с дефектной функцией [9]. В этих условиях иммунный статус организма поддерживается за счет субпопуляции полноценных лимфоцитов, от свойств рецепторного аппарата, которых, и функциональной активности плазмалеммы, будет зависеть интенсивность иммунного ответа [8]. Согласно данным ряда исследователей, активация лимфоцитов химическими раздражителями и митогенами увеличивает гетерогенность поверхности [3, 7] и способствует появлению на одном из концов клеток уropодов, используемых для передвижения [13]. Полагают, что уropоды

представляют собой участки РНК, которые могут отрываться с поверхности лимфоцита и нести информацию другим клеткам [20]. В связи с этим, актуальным является изучение особенностей рельефа поверхности иммунокомпетентных лимфоцитов на различных стадиях течения заболевания, так как во время лечения в организме могут появляться эндогенные токсины [5], вследствие действия химиотерапевтических препаратов, которые оказывают влияние на характер рельефа поверхности.

Цель работы – изучить особенности рельефа поверхности лимфоцитов при развитии острого миелобластного лейкоза на стадии лечения и ремиссии болезни.

### Материалы и методы исследования

Экспериментальные исследования выполнены на венозной крови больных ОМЛ на стадии лечения (5 проб) и больных ОМЛ на стадии ремиссии (5 проб). В качестве контроля использовали кровь здоровых людей в возрасте от 25 до 45 лет (25 проб). Забор периферической крови осуществляли на базе клинико-диагностической лаборатории областной клинической больницы г.Белгорода. Кровь брали из локтевой вены с участием

специализированного медицинского персонала. Пробы крови собирали в вакуумные пробирки Vacuette КЗЕ, содержащие сухую ЭДТА в концентрации 2,0 мг на 1 мл крови. Лимфоциты из цельной крови выделяли путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 5 мин.

Рельеф поверхности лимфоцитов изучали с использованием атомно-силового микроскопа (АСМ) ИНТЕГРА Вита (конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа Olympus IX-71). Суспензию лимфоцитов наносили на чистые обезжиренные стеклянные подложки, которые помещали во влажную камеру для сохранения их жизнеспособности [19]. Проводили сканирование клеток из каждой пробы в полуконтактном режиме с частотой развертки 0,6-0,8 Hz, используя кантилевер серии NSG01, с жесткостью 2,5 Н/м и радиусом закругления 3 нм. На полученных сканах с помощью программного обеспечения «Nova» (Зеленоград, 2009) строили кривые профиля участков поверхности лимфоцитов размером 2x2 мкм, на которых измеряли габаритные размеры и подсчитывали число глобулярных выступов, а также углублений (рисунок).

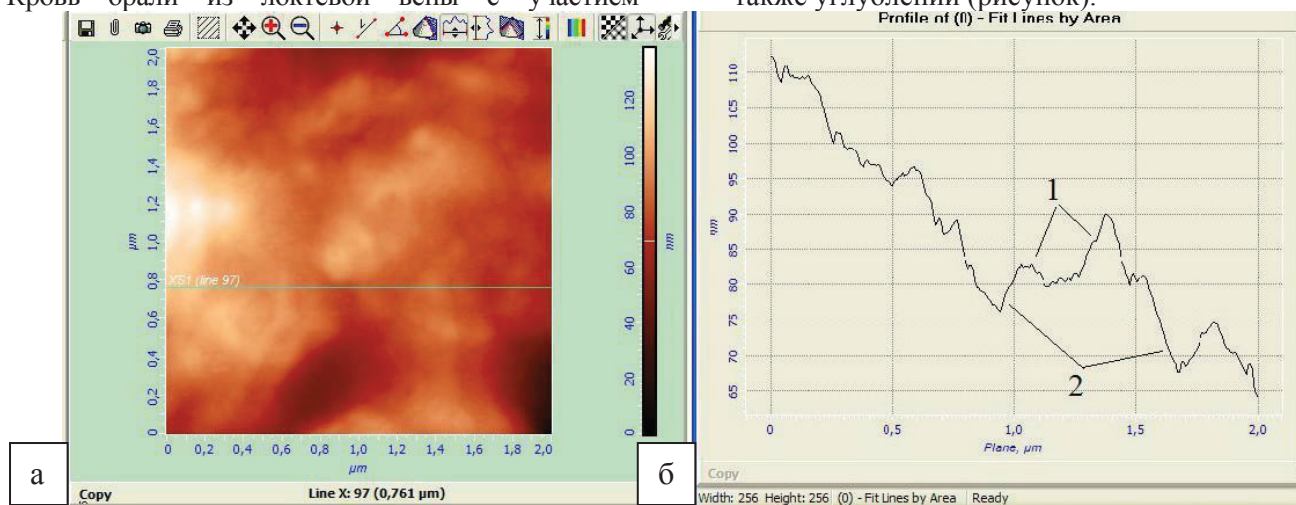


Рисунок. АСМ-изображение (а) и вид профиля поверхности лимфоцита (б) вдоль линии сканирования: 1 – глобулярные выступы, 2 – углубления.

Figure. AFM image (a) and profile view of the surface of the lymphocyte (б) along the scan line: 1 – globular protrusions, 2 –groove

Результаты экспериментальных исследований обработаны методами вариационной статистики. Достоверность различий определяли с использованием t критерия Стьюдента при  $p < 0,05$ , так как исследуемые параметры находятся в пределах нормального распределения.

### Результаты исследования и их обсуждение

У больных ОМЛ на стадии лечения число глобулярных выступов уменьшилось на 72,5% ( $p < 0,05$ ), на фоне снижения их высоты и увеличения ширины соответственно на 33,4% и 425,4% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. Глубина углублений плазмалеммы увеличились на 23% ( $p < 0,05$ ), ширина снизилась на 62,6 ( $p < 0,05$ ), а их число – сократилось на 41,5% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (табл.).

Таблица

**Рельеф поверхности лимфоцитов**

Table

**The relief of the surface of lymphocytes**

Структуры поверхности		Контроль	ОМЛ	
			лечение	ремиссия
Глобулярные выступы	число	36± 0,9	9,89±1,80*	7,84±3,95*
	высота, нм	41,3±3,7	27,52±2,96	32,25±2,95
	ширина, нм	15 ± 0,9	78,81±21,66*	112,35±4,14*
Углубления (инвагинации)	число	18± 1,1	10,52±1,80*	7,81±1,20*
	глубина, нм	17,3±0,6	21,28±1,98	39,49±5,56*
	диаметр, нм	221,8±24,0	82,46±21,71*	62,19±2,64*

\*- Статистически достоверные различия между значениями в опытной и контрольной пробах по критерию Стьюдента при  $p < 0,05$ .

У больных ОМЛ на стадии ремиссии число глобулярных выступов снизилось на 78,2% ( $p < 0,05$ ), на фоне снижения их высоты и увеличения ширины соответственно на 22% и 649% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. Глубина углублений плазмалеммы увеличились на 128,3% ( $p < 0,05$ ), ширина уменьшилась на 72% ( $p < 0,05$ ), а их число – сократилось на 56,6% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем

У больных острой формой миелобластного лейкоза на стадии лечения и ремиссии уменьшилось общее число глобулярных выступов и впадин. Рельеф поверхности был более сглажен за счет уменьшения высоты глобулярных структур, при этом их ширина увеличилась на стадии лечения в 5,2 раза, а в состоянии ремиссии - в 7,5 раз по сравнению с контролем. На стадии ремиссии глубина инвагинаций возросла в 2,3 раза, а их диаметр уменьшился в 3,5 раза по сравнению с контролем. При лечении наблюдается увеличение глубины, при уменьшении диаметра углублений в 2,7 раза.

Согласно полученным данным при развитии острого миелобластного типа лейкоза рельеф поверхности лимфоцитов существенно изменяется на стадиях лечения и ремиссии. Можно предположить, что выявленные изменения происходят в связи с частичным или полным разрушением нитей актина [15]. Немаловажную роль в изменении числа выступов и инвагинаций играет взаимодействие между молекулами CD7 и HLA-DR [2]. С другой стороны, причинами изменения рельефа поверхности могут служить перестройки, возникающие в цитоскелете и клеточной мембране под действием химиотерапии. При этом происходят существенные нарушения липидных и белковых компонентов биомембран, что

вызывается усилением аэробного окисления углеводов и подавлением процессов окислительного фосфорилирования. в результате чего поверхность лимфоцитов «сглаживается», что впоследствии приведет к изменению межклеточных взаимодействий [1].

**Заключение**

Таким образом, развитие острого миелобластного типа пролиферации в стадии обострения и ремиссии характеризуется появлением лимфоцитов со сглаженным рельефом поверхности. Выявленные особенности имеют значение в области диагностики функционального состояния клеток крови.

**Список литературы**

1. Казарян П.А., Дагбашян С.С., Галоян А. А. Мембранные аспекты патогенеза и терапии миелолифолиферативных заболеваний // Национальная академия наук Армении. 2011. Т. 111. С. 59-68.
2. Колбацкая О.П., Тупицын Н.Н. Субпопуляции лимфоцитов костного мозга у больных острыми лейкозами в период диагностики заболевания // Иммунология. 2012. Т. 33. № 2. С. 77-82.
3. Сладкова Е.А. Влияние митогенов на структуру и механические свойства плазмалеммы лимфоцитов больных ОЛЛ // Сборник материалов 17-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века»: Дис. ... д-ра биол. наук. М., 2013. 454 с.
4. Смирнова О.В. Хронический миелолейкоз – клинические и иммунологические особенности у взрослых больных // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. 2012. № 3. С. 185-189.
5. Титов В.Н. Экзогенные и эндогенные патологические факторы (патогенны) как причина воспаления // Клиническая лаб. диагностика. 2004. № 5. С. 3-10.
6. Шамрай Е.А., Рядинская А.Г., Беляева С.С. Упруго-эластические свойства и рельеф поверхности лимфоцитов больных острым и хроническим

миелобластным лейкозом // Научный результат. 2016. Т. 2. № 1(7). С.23-26.

7. Carr I., Clarke J.A., Salsbury A.J. The surface structure of mouse peritoneal cells a study with the scanning electron microscope // *J. Microsc.* 1969. V. 89. P. 105-111.

8. Chaplin D.D. Overview of the immune response // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010. 125:S3-23.

9. mTOR signaling is activated by FLT3 kinase and promotes survival of FLT3-mutated acute myeloid leukemia cells / Chen W., Drakos E., Grammatikakis I., Schlette E.J., Li J., Leventaki V. // *Mol Cancer* 2010; 9: 292.

10. Itoh T., Takenawa T. Mechanisms of membrane deformation by lipid-binding domains // *Prog. Lipid. Res.* 2009. V. 48. P. 298-305.

11. Insall R.H., Machesky L.M. Actin dynamics at the leading edge: From simple machinery to complex networks // *Dev. Cell.* 2009. V. 17. P. 310-322.

12. Le Clairche C., Carlier M.F. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration // *Physiol. Rev.* 2008. V. 88. P. 489-513.

13. Marshall W.H., Roberts K.B. Continuous cinematography of human lymphocytes cultured with a phytohaemagglutinin including observations on cell division and interphase // *Quart. J. Physiol.* 1965. V. 50. P. 361-374.

14. McMahon H.T., Gallop J.L. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodeling // *Nature.* 2005. V. 438. P. 590-596.

15. Negulyaev Yu.A., Vedernikova E.A., Maximov A.V. Disruption of actin filaments increases the activity of sodium-conducting channels in human myeloid leukemia cells // *Mol. Biol. Cell.* 1996. V. 7. P. 326-327.

16. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate function as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion / Raucher D., Stauffer T., Chen W., Shen K., Guo S., York J.D., Sheetz M.P., Meyer T. // *Cell.* 2000. V. 100. P. 221-228.

17. Riccioni // *Hematologic.* 2007. V. 92. P. 81-94.

18. Sahai E. Mechanisms of cancer cell invasion // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2005. V. 15. P. 87-96.

19. Evaluation of morphometric parameters of native blood cells by atomic force microscopy / Skorkina M.Yu., Chernyavskiy S.D., Fedorova M.Z., Zabinyakov N.A., Sladkova E.A. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2010. V. 150(2). P. 238-240.

20. Weis L. Some comments on RNA as a component of the cell periphery // *Wistar Inst. Symp. Monogr.* 1968. V. 8. P. 73-89.

## References

1. Kazaryan P.A., Daghbashyan S.S., Galoyan A.A. The membrane aspects of pathogenesis and therapy of myeloproliferative diseases // *National Academy of sciences of Armenia.* 2011. Vol. 111. No. 1. Pp. 59-68.

2. Kolbatskaya O. P., Tupitsyn N. N. Lymphocyte subpopulations of the bone marrow in patients with acute leukemia in the diagnosis of the disease // *Immunology.* 2012. Vol. 33. № 2. Pp. 77-82.

3. Sladkova E.A. Influence of mitogens on the structure and mechanical properties of the plasmalemma of lymphocytes in ALL patients // *Collection of materials of the 17th International Pushchino School-Conference of Young Scientists «Biology - Science of the XXI Century»: Dis. ... Dr. Biol. Sciences. M., 2013. 454 p.*

4. Smirnova O.W. Chronic myeloleukemia – clinical and immunological features of adult patients. *Bulletin of the East-Siberian Scientific Center of the SB RAMS.* 2012. № 3. Pp. 185-189.

5. Titov V.N. Exogenous and endogenous pathological factors (pathogens) as the cause of inflammation // *Clinical Lab. diagnostics.* 2004. № 5. Pp. 3-10.

6. Shamray E.A., Ryadinskaya A.G., Belyaeva S.S. Elastic properties and surface topography lymphocytes in patients with acute and chronic myelogenousleukemia // *Research Result.* 2016. V. 2. № 1 (7). Pp.23-26.

7. Carr I., Clarke J.A., Salsbury A.J. The surface structure of mouse peritoneal cells a study with the scanning electron microscope // *J. Microsc.* 1969. V. 89. Pp. 105-111.

8. Chaplin D.D. Overview of the immune response // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010. 125. Pp. 3-23.

9. mTOR signaling is activated by FLT3 kinase and promotes survival of FLT3-mutated acute myeloid leukemia cells / Chen W., Drakos E., Grammatikakis I., Schlette E.J., Li J., Leventaki V. // *Mol Cancer* 2010; 9: 292.

10. Itoh T., Takenawa T. Mechanisms of membrane deformation by lipid-binding domains // *Prog. Lipid. Res.* 2009. V. 48. Pp. 298-305.

11. Insall R.H., Machesky L.M. Actin dynamics at the leading edge: From simple machinery to complex networks // *Dev. Cell.* 2009. V. 17. Pp. 310-322.

12. Le Clairche C., Carlier M.F. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration // *Physiol. Rev.* 2008. V. 88. P. 489-513.

13. Marshall W.H., Roberts K.B. Continuous cinematography of human lymphocytes cultured with a phytohaemagglutinin including observations on cell division and interphase // *Quart. J. Physiol.* 1965. V. 50. Pp. 361-374.

14. McMahon H.T., Gallop J.L. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodeling // *Nature.* 2005. V. 438. Pp. 590-596.

15. Negulyaev Yu.A., Vedernikova E.A., Maximov A.V. Disruption of actin filaments increases the activity of sodium-conducting channels in human myeloid leukemia cells // *Mol. Biol. Cell.* 1996. V. 7. Pp. 326-327.

16. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate function as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion / Raucher D., Stauffer T., Chen W., Shen K., Guo S., York J.D., Sheetz M.P., Meyer T. // *Cell.* 2000. V. 100. Pp. 221-228.

17. Riccioni // *Hematologic.* 2007. V. 92. Pp. 81-94.

18. Sahai E. Mechanisms of cancer cell invasion // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2005. V. 15. Pp. 87-96.

19. Evaluation of morphometric parameters of native blood cells by atomic force microscopy / Skorkina M.Yu.,

Chernyavskiy S.D., Fedorova M.Z., Zabinyakov N.A., Sladkova E.A. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2010. V. 150(2). Pp. 238-240.

20. Weis L. Some comments on RNA as a component of the cell periphery // *Wistar Inst. Symp. Monogr.* 1968. V. 8. Pp. 73-89.

**Рядинская Анна Григорьевна**, студентка 4 курса

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»),

ул. Победы, 85, г. Белгород, 308015, Российская Федерация

*E-mail: 937337@bsu.edu.ru*

**Сыроватская Ольга Владимировна**, врач-лаборант

ОГБУЗ «Белгородский онкологический диспансер»,

ул. Куйбышева, 1, г. Белгород, 308010, Российская Федерация

**Ryadinskaya Anna Grigoryevna**, 4-th-year Student  
Belgorod State National Research University  
85 Pobedy St., Belgorod, 308015, Russia  
*E-mail: 937337@bsu.edu.ru*

**Syrovatska Olga Vladimirovna**, Laboratory Doctor  
Belgorod Oncology Centre  
1 Kuibyshev St., Belgorod, 308010, Russia